

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16347

鳎草根际固氮菌的分离鉴定及培养条件的筛选

王琦¹, 李文涛¹, 张沛东¹, 张秀梅^{1,2}

1. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266072

摘要: 为了解鳎草(*Zostera marina*)根际微生物的共生固氮功能, 并分离得到对海草有潜在促生效果的功能微生物, 以山东荣城天鹅湖鳎草为研究对象, 采用选择性固氮培养基从其根际分离得到了两株具较高固氮酶活性的菌株(3A 和 4G), 从形态学、生理生化特性、16S rDNA 和固氮基因 *nifH* 等方面对菌株进行筛选和鉴定, 探讨菌株的最佳培养条件并获得了菌株典型生长曲线。结果表明, 菌株 3A 为海旋菌(*Thalassospira*), 革兰氏阳性菌, 菌落圆形桔黄色, 可利用的碳源: D-甘露糖, D-松三糖, L-鼠李糖等, 最佳培养条件: 盐度 2.585%, pH 8.18, 温度 31.49℃; 菌株 4G 为芽孢杆菌(*Bacillus*), 革兰氏阴性菌, 菌落圆形乳白色, 可利用的碳源: D-纤维二糖, D-葡萄糖, D-麦芽糖, 蔗糖, D-甘露醇, D-海藻糖等, 最佳培养条件: 盐度 2.920%, pH 7.99, 温度 37.27℃。利用乙炔还原法测定二者的固氮酶活性, 分别为 252.21 nmol C₂H₄/(mL·h)和 196.31 nmol C₂H₄/(mL·h)。研究证实两株菌株具有良好的固氮性能, 可用于海草固氮肥的研制, 在海草床生态系统恢复研究领域具有潜在的应用前景。

关键词: 鳎草; 固氮菌; 16S rDNA; 固氮酶活性; 芽孢杆菌; 海旋菌

中图分类号: S95

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)04-0791-11

海草是唯一可以适应海洋生活环境并开花结籽的单子叶植物, 主要分布在温带、亚热带和热带海域浅水区, 具有很高的生产力水平和重要的生态功能及经济价值。近年来, 海草床正面临着生态功能和资源急剧衰退的危机^[1], 全球约 1/3 的海草资源已经消失, 且消失速度正在加快^[2]。中国的海草资源也同样面临海草床面积减少、海草覆盖度降低等生态问题。胶东半岛曾分布丰富的鳎草(*Zostera marina*)资源^[3], 但近 20 年, 仅山东省威海海域就有超过 90% 的海草床在迅速消失, 其消失速率远高于全球海草床 29% 的总消失率^[1], 海草床资源修复和保护工作迫在眉睫。

微生物在全球的化学循环中发挥着重要作用^[4-5]。固氮微生物可以在固氮酶的作用下通过生物固氮作用将大气中的分子氮转化成氨, 参与氮素循环^[6]。海洋中固氮微生物种类繁多, 多以附生

和联合共生等形式与其他海洋动物或者水生植物根部形成固氮体系, 对海洋初级生产力贡献巨大^[7-8]。微生物作为海草床生态系统中重要的分解者, 在生态系统的物质循环和能量流动中发挥重要作用, 其中的功能微生物还在海草、甲壳动物、刺参等动植物的生长和资源恢复中扮演着重要角色。海草床生态系统的固氮微生物主要包括附生或缠绕在茎、叶上的固氮蓝藻和共生在根周围的异养固氮细菌。1904 年, 德国微生物学家 Lorenz Hiltner^[9]首次提出了根际的概念, 将其定义为根系周围、受根系生长影响的土体。根际是一个特殊生态环境, 根际微生物数量和类型要比根外微生物丰富得多, 根际菌在根上的繁殖和分布与根系生长发育相互影响形成根际效应, 因而根系微生物的研究亦备受关注^[10]。在海草根际环境中, 植物残体及根分泌的有机碳为固氮菌提供了碳源,

收稿日期: 2016-11-24; 修订日期: 2017-03-03.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41576112); 国家海洋公益性行业科研专项(201305043).

作者简介: 王琦(1986-), 女, 博士, 从事渔业环境修复研究. E-mail: ocean_qq@163.com

通信作者: 张秀梅, 教授, 主要从事鱼类行为生态学、渔业资源保护学及增殖生态学研究. E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

固氮菌通过固氮作用又可以为植物生长提供氮源,进而促进海草资源的恢复^[11]。

海草床生态系统中参与氮循环的微生物类群种类多样,并且大多数种类仍未获得纯分离培养。目前对海草床生态系统中氮循环功能微生物多样性的理解主要来源于对群落结构的分析,相关研究多围绕在关键酶功能基因的系统发育分析及基因序列在克隆文库中的相对丰度等方面。Weidne 等^[12]利用免培养法分析了喜盐草属(*Halophila*)共附生菌的多样性; Bagwell 等^[13]利用变性梯度凝胶电泳技术研究发现,互花米草(*Spartina alterniflora*)共附生固氮菌大多是厌氧菌; Jensen 等^[14]则利用 T-RFLP 法研究了鳗草根际共附生细菌。迄今,国内关于海草共附生微生物分离培养的研究报道较少,仅见 2004 年肖义平等^[15]从互花米草中分离得到一株真菌 *Fwsarfum* sp.; 2010 年凌娟等^[16]从泰来藻(*Thalassia hemperichii*)中分离得到一株固氮成团泛菌(*Pantoea agglomeran*)和 2012 年吴后波等^[17]从泰来藻中分离获得的放线菌等(*actino bacteria*)相关研究。而关于海草床生态系统中鳗草根际共生固氮菌的分离及功能研究尚未见报道。

本研究以山东荣成天鹅湖海草床生态系统中的鳗草为实验对象,采用选择性固氮培养基从鳗草根际分离到了两株具有较高固氮酶活性的菌株 3A 和 4G,并从形态学特征、生理生化特性、16S rDNA 以及 *nifH* 固氮基因序列分析等方面进行种类鉴定,对菌株的最适温度、最适 pH 以及最佳盐度等培养条件进行筛选,在上述基础上测定了每个菌株的典型生长曲线,以确定固氮菌株的最佳培养条件,旨在将分离得到具较高固氮酶活性的菌株用于固氮菌肥的研制,推动海草床受损生态系统鳗草资源的恢复与保护。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品采集地点位于山东省荣成市天鹅湖(36.43°N, 122.26°E),其潮间带和潮下带区域分布有大量鳗草,形成了大面积海草床。2014 年 8 月,在天鹅湖鳗草聚集区依照对角线设 12 个采样点,每个站点采集 6 株植株的完整根部及附着沉积物,

去除表面沉积物,将松散黏附在根系表面 1~4 mm 内的沉积物小心收集于封口灭菌聚乙烯袋后保存于冰盒内^[18-19],尽快带回实验室后于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 培养基

选择性固氮培养基根据 Smith^[20]的配方进行了改良,用于分离、纯化固氮菌及固氮酶活性测定: FeSO₄·7H₂O 0.001 g, KCl 0.56 g, MgCl₂·6H₂O 4.0 g, NaCl 25 g, MgSO₄·7H₂O 4.8 g, K₂HPO₄ 0.01 g, Tris 0.48 g, 蛋白胨 4.0 g, 酵母粉 2.0 g, 甘油 2.0 mL, 超纯水 1000 mL, pH 8.2。

LB 培养基^[21]: 用于培养、鉴定纯化的固氮菌。蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 25 g, 超纯水 1 L。固体培养基需添加 2% 的琼脂, 1×10⁵ Pa 高温高压蒸汽灭菌。

1.3 菌株的分离与纯化

取 1 g 鳗草根际沉积物置于 200 mL 的选择性固氮液体培养基中,于 30℃ 下 180 r/min 摇床恒温富集培养 48 h。将富集后的菌液稀释成不同梯度(10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷),吸取 200 μL 菌液涂布于选择性固氮培养基,每个梯度做 3 个重复,30℃ 恒温培养 48 h,挑取单一菌落多次划线纯化保存备用。

1.4 菌株的生理生化鉴定

革兰氏染色是细菌学中最重要也是最基本的鉴别染色技术^[22],将纯化的菌株接种到 LB 培养基,30℃ 培养过夜,染色后用光学显微镜来观察细菌的形态和大小,观察培养 24 h 菌龄的菌落特征。

细菌的生理生化鉴定依据是微生物的代谢特征。选用 18~24 h 新鲜培养的菌株,运用梅里埃 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪鉴定选取菌株的生理生化特征。

1.5 菌株 16S rDNA 和 *nifH* 基因的 PCR 扩增

在细菌基因组中,编码 16S rRNA 的 16S rDNA 基因具有良好的进化保守性,由于它具有适宜分析的长度(约为 1.5 kb),以及与进化距离相匹配的良好变异性,所以成为细菌分子鉴定的标准标识序列^[23]。将选择性固氮培养基初筛获得的细菌接种于 LB 液体培养基中,37℃、200 r/min 恒温培养过夜,将 1 mL 过夜培养的菌液 10000 r/min 离心 2 min,弃上清,收集菌体,运用上海生工的

磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA。以磁珠法提取得到的细菌 DNA 为模板, 以细菌 16S rDNA 全序列通用引物 27F/1492R^[23]和固氮基因 *nifH* 特定的引物 PolF/PolR^[24]分别进行 PCR 扩增, 16S rDNA 全序列扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。 *nifH* 基因扩增条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 个循环; 72℃ 7 min。取 2 μL PCR 产物, 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行产物验证。

扩增的 PCR 产物送公司(上海美吉生物医药科技有限公司)测序, 所得测序结果通过软件 DNAMAN 剔除嵌合体等不合格序列, 非嵌合体序列在 NCBI 数据库完成相似性比对, 从 GenBank 数据库选取相似性高的典型菌株 16S rDNA 序列, 运用 Clustal_X 软件多重序列比对并计算菌株序列间的相似性, 依据最大同源性原则, 在序列对比的基础上使用 MEGA 4.1 软件的邻接法构建 Neighbor-joining 进化树, 运用 Jukes-Cantor 及 Kimura's 2-parameter 两种计算法, Bootstrap 评估值设为 1000 次, 进行系统发育分析。

1.6 固氮酶活性的检测

根据 Dong 等^[25-27]的方法进行菌株固氮酶活性的测定, 将保存的菌株活化后接种于选择性固氮液体培养基中, 恒温 30℃ 培养 72 h 后统一调整 OD₆₀₀, 将 1 mL 菌液加入 5 mL 的无菌顶空进样瓶, 注射器取 1 mL 乙炔注入瓶中, 30℃ 恒温振荡培养 24 h 后, 取 40 μL 反应后气样在气相色谱仪上测定生成的乙烯峰值。以每小时每毫升培养物产生的乙烯[nmol C₂H₄/(mL·h)]表示固氮酶活性, 计算公式为:

乙炔还原活性[nmol/(mL·h)]=注入标准气体积(mL)×标准气浓度(nmol/mL)×样品乙烯峰面积(cm²)×所用试管体积(mL)/样品注入体积(mL)/标准气峰面积(cm²)/培养时间(h)/22.4

1.7 细菌培养条件的研究

1.7.1 温度 取等量的细菌培养液接种于 LB 液体培养基上, 每个温度做 4 个平行, 分别置于 15℃、20℃、25℃、30℃、37℃、40℃ 培养箱中 180 r/min 恒温振荡 48 h, 测定其 OD₆₀₀ 的平均值,

确定菌株的最适生长温度。

1.7.2 pH 取等量细菌培养液接种于初始 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的 LB 液体培养基上, 每个 pH 做 4 个平行, 30℃ 下 180 r/min 恒温振荡 48 h, 测定其 OD₆₀₀ 的平均值, 确定菌株的最适生长 pH。

1.7.3 盐度 取等量细菌培养液接种到含氯化钠质量分数为 0、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0% 的 LB 液体培养基上, 30℃ 下 180 r/min 恒温振荡 48 h, 测定其 OD₆₀₀ 的平均值, 确定菌株的最适生长盐度。

1.8 菌株生长曲线的测定

将保存的菌株活化后, 接种于 200 mL 的 LB 液体培养基中, 在 30℃ 下 180 r/min 恒温振荡 12 h 作为待测菌液。按 2% 的接种量将菌液接种于各菌株最适宜生长条件的 200 mL LB 液体培养基锥形瓶中, 分装到标记为 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、24 h 的 13 支无菌试管中, 立即将除 0 h 外的其余 12 支试管置于对应菌株最适宜温度的恒温培养箱中振荡培养, 每隔 2 h 取出对应编号的菌液, 以无菌的 LB 液体培养基为对照, 在 600 nm 的波长下运用分光光度计测定菌株不同培养时间菌液的 OD₆₀₀ 值, 每个样品重复测定 3 次取平均值。以对应的培养时间为横坐标, OD₆₀₀ 值为纵坐标绘制菌株的生长曲线。

2 结果与分析

2.1 固氮菌的分离筛选和形态学特征

通过富集培养和梯度稀释涂布, 从天鹅湖鳗草根际分离到 10 株能在选择性固氮培养基上生长的菌株。经过 5 代的分离纯化后, 通过扩增 10 株菌株的固氮酶基因 *nifH* 进行复筛, 最终只从 2 株菌株中扩增得到固氮酶目的基因。一株编号为 3A(图 1), 形态学特征可描述为: 杆状菌, 桔黄色, 光滑, 微湿润, 不透明, 圆形, 隆起, 边缘整齐, 革兰氏阳性菌。另一株编号为 4G(图 2), 形态学特征可描述为: 杆状菌, 乳白色, 光滑, 湿润, 半透明, 圆形, 隆起, 边缘整齐, 革兰氏阴性菌。

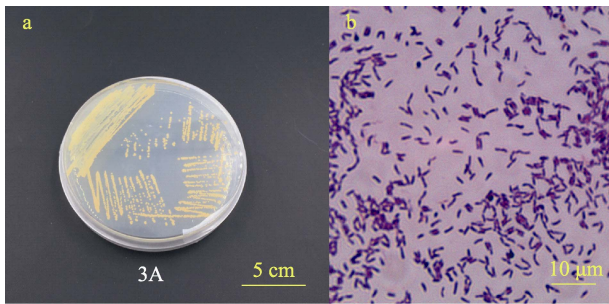


图 1 天鹅湖鳗草根际分离的菌株 3A 形态学特征
a. 固氮培养基上菌落形态; b. 菌株革兰氏染色
Fig. 1 Morphological features of strain 3A isolated from rhizosphere of *Zostera marina*
a. the colonial morphology on N-free medium; b. gram staining for strain

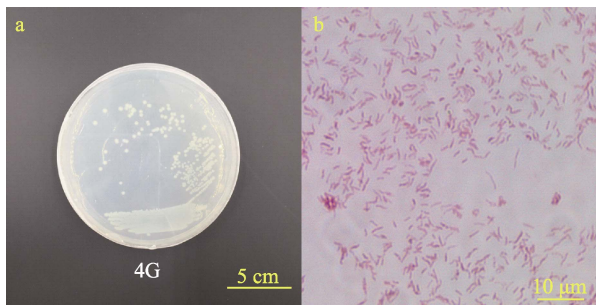


图 2 天鹅湖鳗草根际分离的菌株 4G 形态学特征
a. 固氮培养基上菌落形态; b. 菌株革兰氏染色
Fig. 2 Morphological features of strain 4G isolated from rhizosphere of *Zostera marina*
a. the colonial morphology on N-free medium; b. gram staining for strain.

2.2 固氮菌的生理生化特征

生理生化特征的测定可以反映菌株的本质特征,是其本身某种代谢途径或某种酶的特有表现,从而可以将微生物区分成不同类群。根据梅里埃 VITEK 2 Compact 全自动细菌检测仪分析结果,并参考《伯杰细菌鉴定手册》^[28],发现菌株 3A 生理生化特征为好氧菌,不产生吲哚,甲基红反应阳性,氧化酶、淀粉酶反应阴性,V-P 测定阳性,明胶水解阴性,可利用碳源为: D-甘露糖, D-松三糖, L-鼠李糖等,不利用柠檬酸盐。菌株 4G 生理生化特征为好氧菌,产生吲哚,甲基红反应阳性,氧化酶、淀粉酶反应阳性, V-P 测定阳性,明胶水解阴性,可利用的碳源: D-纤维二糖, D-葡萄糖, D-麦芽糖,蔗糖, D-甘露醇, D-海藻糖等,鸟氨酸脱羧酶阴性,不利用柠檬酸盐和丙二酸盐(表 1)。

表 1 菌株生理生化特征
Tab. 1 The physiological and biochemical characteristics of two strains

生理生化特征	characteristics	3A 菌株 strain of 3A	4G 菌株 strain of 4G
吲哚实验	Indole production	—	+
甲基红	methyl red	+	+
氧化酶	oxidases	—	+
淀粉酶	amylase	—	+
V-P 反应	Voges-Proskauer reaction	+	+
明胶水解	gelatin liquefaction	—	—
赖氨酸脱氢酶	lysopine dehydrogenase	ND	—
鸟氨酸脱羧酶	ornithine decarboxylase	ND	—
α-葡萄糖	α-glucose	ND	+
D-甘露糖	D-mannose	+	ND
D-松三糖	D-melezitose	+	ND
L-鼠李糖	L-rhamnose	+	ND
D-海藻糖	D-trehalose	ND	+
D-葡萄糖	glucose	ND	+
D-麦芽糖	D-maltose	ND	+
蔗糖	sucrose	ND	+
D-甘露醇	D-mannose	—	+
D-纤维二糖	D-cellobios	ND	+
柠檬酸盐	citrate	—	—
硫化氢	hydrogen sulfide	ND	—
丙二酸盐利用	saline malonate	—	—

注:“+”表示菌株反应为阳性;“—”表示菌株反应为阴性;ND表示未测定。
Note:“+” denotes more bacteria was positive reaction;“—” denotes more bacteria was negative reaction; ND: not determined.

2.3 nifH 基因扩增及固氮酶活性测定

固氮酶是微生物执行固氮功能的关键酶, *nifH* 基因作为固氮酶的重要组成部分,编码的蛋白质高度保守,并且与 16S rDNA 构建的系统发育树有一致性^[29],可作为固氮微生物的分子标记。运用 *nifH* 兼并引物对分离到的 10 株菌株进行目的基因扩增,只从 2 株菌株中扩增得到 *nifH* 基因,目的片段长度 360 bp 左右(图 3)。

运用乙炔还原法测定了分离得到的 2 株固氮菌固氮酶活性,通过分析乙炔峰图和公式计算得出,菌株 3A 的固氮酶活为 252.21 nmol C₂H₄/(mL·h),菌株 4G 的固氮酶活为 196.31 nmol C₂H₄/(mL·h)。结合 *nifH* 基因扩增和固氮酶活性测定最终确定菌株 3A 和 4G 均具有固氮能力。

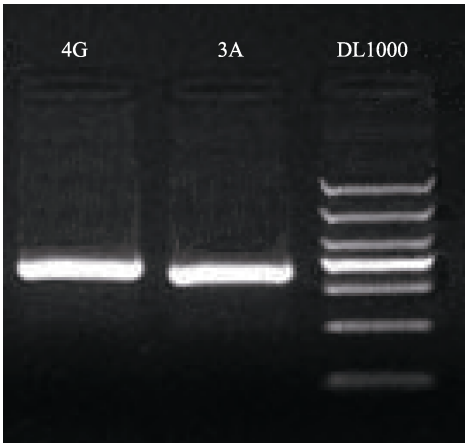


图 3 *nifH* 基因 PCR 扩增图
Fig. 3 Amplification of the *nifH* gene of the isolates

2.4 菌株 16S rDNA 序列 PCR 扩增及系统发育分析

菌株 3A 和 4G 的 16S rDNA 序列结果已提交到 NCBI 的 GenBank 数据库, 通过 BLAST 在线比

对, 选取与 3A 和 4G 菌株同源性相近菌株的 16S rDNA 序列构建系统发育进化树(图 4, 图 5)。根据菌株的形态特征、生理生化反应和 16S rDNA 序列系统发育的综合分析, 3A 菌株与芽孢杆菌属 *Bacillus firmus* strains S26-2(DQ 514315.1)的相似度大于 99%, 鉴定 3A 菌株为芽孢杆菌(*Bacillus*), 命名为 *Bacillus* sp. 3A, 属厚壁菌门(Firmicutes), 芽孢杆菌纲(Bacilli), 芽孢杆菌目(Bacillales), 芽孢杆菌科(Bacillaceae), GenBank 登录号为 KY659582; 4G 菌株与海旋菌 *Thalassospira* sp. PR54-1(EU 440798.1)的相似度大于 99%, 鉴定 4G 菌株为海旋菌(*Thalassospira*), 命名为 *Thalassospira* sp. 4G, 属变形菌门(Proteobacteria), α -变形菌纲(Alphaproteobacteria), 红螺菌目(Rhodospirillales), 红螺菌科(Rhodospirillaceae), GenBank 登录号为 KY659583。

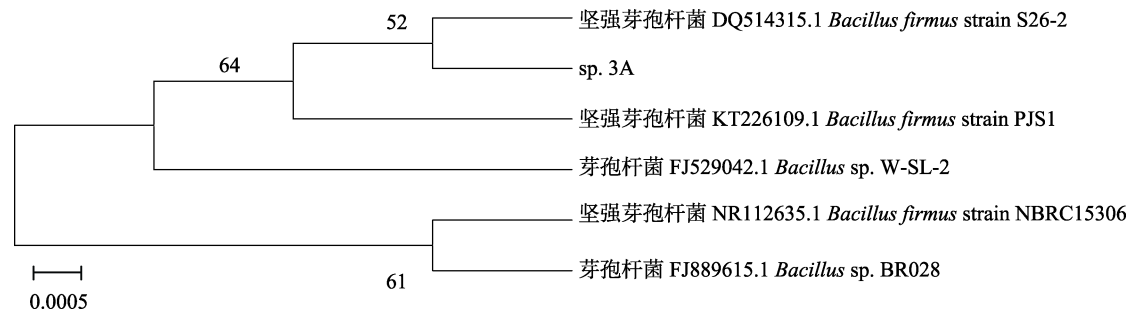


图 4 菌株 3A 及其相关菌株的 16S rDNA 序列系统发育进化树
分支处数字表示 1000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比; 标尺 0.0005 为进化距离.
Fig. 4 Phylogenetic tree of strain 3A based on the 16S rDNA sequences of related species
The value in the branch stand for the Bootstrap value; the tree is based on a 1000 bootstrap procedure the scale bar 0.0005 in terms of genetic distance is indicated below the tree.

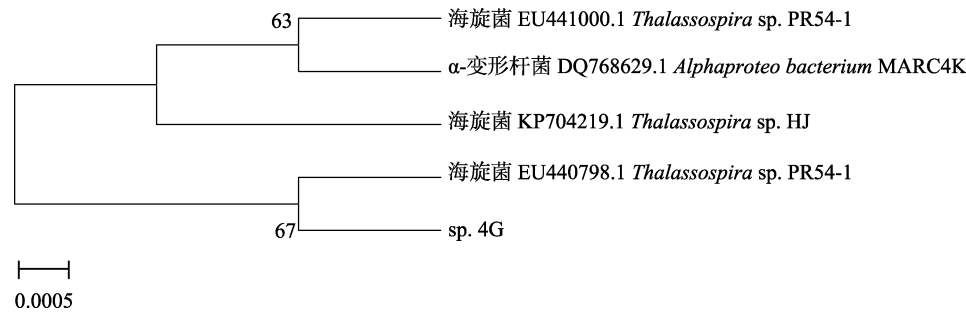


图 5 菌株 4G 及其相关菌株的 16S rDNA 序列系统发育进化树
分支处数字表示 1000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比; 标尺 0.0005 为进化距离.
Fig. 5 Phylogenetic tree of strain 4G based on the 16S rDNA sequences of related species
The value in the branch stand for the Bootstrap value; the tree is based on a 1000 bootstrap procedure the scale bar 0.0005 in terms of genetic distance is indicated below the tree.

2.5 菌株的最优培养条件

OD₆₀₀ 是研究液体培养物中细菌生长的标准方法,细菌在 600 nm 波长可见光谱范围内无天然色素吸收干扰影响定量,因此形状规则的(近似球形)微生物菌浓度(干重)和吸光度在 OD₆₀₀ 下呈现线性关系,可用于细菌生长发育特性的相关研究^[30-31]。本组实验以未接种的 LB 液体培养基作为空白对照。实验结果以 OD₆₀₀ 吸光值为纵坐标,培养条件变量为横坐标,生成坐标图。

2.5.1 温度对菌株生长的影响 如图 6 所示,从鳗草根际沉积物分离得到的 2 株固氮菌在 15~37℃ 均能生长,最适宜的生长温度范围为 25~37℃,其中菌株 4G 的适温性更广,在 40℃ 也可生长。菌株间的最适温度存在差异,菌株 3A 和 4G 分别在 30℃、37℃ 时,对应的 OD₆₀₀ 吸光度最高并达到显著水平($P < 0.05$)。根据理论曲线计算,菌株 3A 和 4G 最适生长温度为 31.49℃ 和 37.27℃。

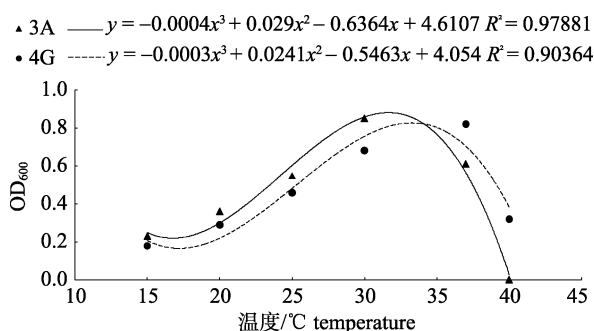


图6 温度条件对固氮菌菌株生长的影响
Fig. 6 Effect of temperature on growth of strains

2.5.2 初始 pH 对菌株生长的影响 如图 7 所示,两株菌在初始 pH 为 5.0~10.0 的培养条件下均能生长,表明分离得到的固氮菌具有较强的适应能力。两株菌的最适 pH 一致,均在 pH 为 8.0 时吸光值达到显著水平($P < 0.05$),根据理论曲线计算,菌株 3A 及 4G 最适 pH 分别为 8.18 和 7.99,说明两株菌更适合在初始偏碱性的培养条件下生长。

2.5.3 盐度对菌株生长的影响 分离得到的两株菌在 0.5%~4% 的盐度范围内均可生长,最适宜的盐度范围为 2%~3%,说明两株菌有较广的盐度适应性(图 8)。两株菌的最适盐度存在差异,菌株 3A 在盐度 2.5%,菌株 4G 在盐度 3% 时吸光值达最高

显著水平($P < 0.05$),理论曲线和实测数据趋势一致,菌株 3A 和 4G 分别在盐度 2.585%、2.920% 时生长最佳。

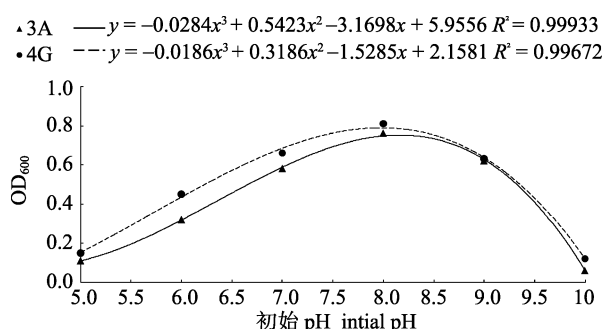


图7 pH 值对固氮菌菌株生长的影响
Fig. 7 Effect of pH on growth of strains

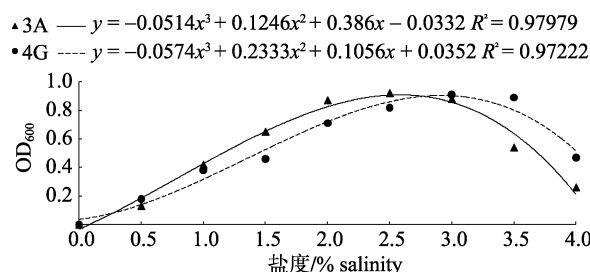


图8 盐度对固氮菌菌株生长的影响
Fig. 8 Effect of salinity on growth of strains

2.6 菌株典型生长曲线的绘制

图 9 所示的菌株典型生长曲线表明,菌株 3A 经过 0~4 h 的延迟期后,于 4~12 h 进入快速生长的对数期,12~18 h 进入了维持 6 h 的稳定期,18 h 后进入衰亡期;菌株 4G 经过 0~2 h 的短暂延迟期后,2~12 h 进入对数期,12~20 h 处于稳定期,20 h 后进入衰亡期。说明筛选得到的固氮菌株 3A 和 4G 均具有一个明显的延迟期、对数期、稳定期和衰亡期的生长过程。

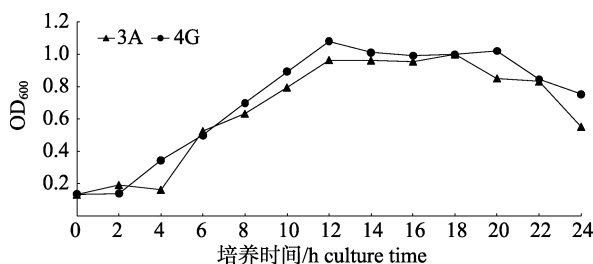


图9 固氮菌菌株典型生长曲线
Fig. 9 Typical growth curves of strains

3 讨论

3.1 鳗草根际固氮菌的分离与鉴定

本研究以天鹅湖鳗草为研究对象,通过选择性固氮培养基初筛和利用 *nifH* 固氮基因扩增与固氮效能测定复筛,分离得到了两株具较高固氮酶活性的菌株:芽孢杆菌(*Bacillus* sp. 3A)和海旋菌(*Thalassospira* sp. 4G),为鳗草海草床微生物修复提供了菌种资源和理论基础。海草床生态系统具有较高的生产力水平,可溶性氮元素是海草床生产力的主要限制营养元素^[32],附着在海草叶面和根际的固氮微生物可通过生物固氮作用将空气的氮气还原成可溶性氨,成为海草床生态系统氮循环的重要氮素来源之一,在海草床消长中发挥着重要作用^[33]。在寡营养盐的热带海洋地区,生物固氮能够为海草提供 1~1.5 倍植物生长所必需的氮素^[34]。海草植物根际有很强的固氮能力,据报道在针叶藻(*Syringodium isoetifolium*)海草床生态系统中,针叶藻根际微生物固氮量占生态系统总氮素需求量的 8%^[35-36]。鳗草是具高生产力水平的温带海洋植物,植株根际有较高的固氮活性,并呈现季节性变化^[37],本研究从鳗草根际得到的 2 株固氮菌的酶活性分别为 252.21 nmol C₂H₄/(mL·h)、196.31 nmol C₂H₄/(mL·h)。凌娟等^[16]从红树林根际分离得到的固氮菌活性为 156.32 nmol C₂H₄/(mL·h),Guzman 等^[38]分离得到的高效棉花植物促生菌的固氮酶活性分别为 206.43 nmol C₂H₄/(mL·h)、292.77 nmol C₂H₄/(mL·h)、460.60 nmol C₂H₄/(mL·h)。与已报道的固氮菌酶活相比,表明本研究获得的固氮菌具有良好的固氮性能,在天鹅湖鳗草海草床生态系统的氮素和营养物质循环中起着重要作用。

固氮菌作为生物肥的潜在应用价值已受到广泛关注,Adriana Rojas 等^[39]研究了固氮菌(*Phyllobacterium* sp.)对红树幼苗的促生效果,发现复合菌肥比单一菌肥更具促生优势。凌娟^[40]从三亚珊瑚礁-泰来藻复合生态系统的海草根际筛选分离得到具固氮酶活性的成团泛菌,本研究从鳗草根际分离的芽孢杆菌(*Bacillus* sp. 3A)和海旋菌(*Thalassospira* sp. 4G)均具较高固氮酶活性,由此丰富了海草根际固氮微生物的研究内容,也为今

后受损海草床微生物底质改良技术研发提供了参考。迄今,关于固氮类芽孢杆菌的报道主要见于陆地土壤的研究中,海洋环境中的相关研究较少,且多基于基因水平。Choi 等^[41]从海底淤泥中分离得到一株芽孢杆菌(*Paenibacillus donghaensis* sp. Nov.),通过分子水平固氮酶基因 *nifH* 的检测,证实了该菌株具有固氮潜能。Dang 等^[42]基于固氮基因 *nifH* 水平研究发现中国南海北部沿岸河口及深海沉积物中均有固氮类芽孢杆菌的分布。张丽红等^[43]从中国南海(20.42°N, 110.51°E)底泥中分离得到了一株能产芽孢的固氮菌。由于固氮类芽孢杆菌具有很强的抗逆性,能够产生对植株有益的促生物质和抗菌物质,由此认为本研究分离得到的固氮芽孢杆菌(*Bacillus* sp. 3A)在菌肥研制方面具有潜在应用价值。董俊德等^[44]利用从泰来藻海草生态系统中分离筛选的深海海旋菌株 Q25-2 处理海草,发现海草植株高度、茎粗、胡萝卜素、类胡萝卜素含量以及可溶性糖含量均高于未做处理的对照组,证明海旋菌对泰来藻具有良好的促生效果。本研究得到的固氮海旋菌(*Thalassospira* sp. 4G)对鳗草是否具有实际的促生作用,尚有待进一步验证。

3.2 固氮菌培养条件的优化

本研究筛选优化了芽孢杆菌(*Bacillus* sp. 3A)和海旋菌(*Thalassospira* sp. 4G)的适宜生长温度、培养初始 pH 及环境盐度水平等培养条件,并获得了两株固氮菌的生长曲线,研究结果为固氮生物菌肥的加工和制作积累了基础数据。

研究表明,微生物在实验培养过程中受到温度条件的直接影响,适宜的温度下微生物可以迅速繁殖生长^[45]。通常在较低温度下,菌株会因新陈代谢受到抑制而减缓菌丝的分裂速度;而较高的温度易导致菌体内酶活失活,影响菌体的生长甚至导致菌体死亡^[46]。本研究证实,2 株固氮菌在 15~37℃ 均能生长,其中菌株 *Thalassospira* sp. 4G 在 40℃ 下也可生长,说明 2 株菌的适温性较广;芽孢杆菌(*Bacillus* sp. 3A)的最适生长温度是 31.49℃,海旋菌(*Thalassospira* sp. 4G)为 37.27℃。另外,探索功能菌株人工培养条件下的最适 pH,对其在生产中的扩大培养和发酵具有重要意义。

研究发现, 2株固氮菌在初始 pH 5.0~10.0 的培养条件下均能生长, 菌株 3A 及 4G 的最适 pH 分别为 8.18、7.99, 说明二者具有较强的适应能力, 且菌株在初始偏碱性的培养条件生长较好, 这与植物生长促生菌的适宜培养条件一致^[47-50]。环境渗透压必须与微生物细胞大致相等, 超过一定限度或渗透压剧变, 都会抑制微生物的生命活动, 甚至引起其死亡^[51]。目前关于渗透压影响固氮菌生长和功能的研究还较少, 申磊等^[52]研究了圆果雀稗(*Paspalum orbiculare*)根、茎中分离到的 5 株内生固氮菌的固氮特性, 发现菌株在 NaCl 浓度达到 0.5% 时的固氮活性最高, 而 NaCl 浓度达到 3% 时菌株无固氮活性表达, 说明过高的盐度条件下雀稗内生固氮菌无法发挥固氮作用。Dicker 等^[53]从沿河湿地分离的 1 株固氮菌在盐度为 1.5%~2.5% 时的固氮活性最高, 进一步证实固氮菌株在适宜的渗透压环境中方具有固氮作用。本研究发现 2 株固氮菌的最适盐度范围是 2%~3%, 在低盐或高盐环境中其生长均受到不同程度的抑制, 50% OD₆₀₀ 值对应的盐度值分别为 0.991%、1.327% 和 3.790%、4.079%, 从天鹅湖海水渗透环境而言, 菌株受高盐抑制作用更明显。

菌株的生长曲线可以反映细菌在培养过程中的生长和繁殖规律, 通过测定细菌的典型生长曲线把握其生长繁殖规律, 可有效控制细菌的生长繁殖并投入生产实践^[30]。本研究表明, 芽孢杆菌(*Bacillus* sp. 3A)和海旋菌(*Thalassospira* sp. 4G)均具有一个明显的延迟期、对数期、稳定期间和衰亡期的生长过程, 且两株菌的增殖存在差异。已有研究发现, 处于不同生长期的一些功能性微生物的核糖体及其胁迫蛋白均有差异^[54], 进而影响微生物的功能效果^[55]。因此, 利用 OD 值监测固氮菌的生长过程, 准确定位其快速生长期对菌种生产应用尤为重要。

4 结论

采用选择性固氮培养基从鳗草根际分离得到了两株具较高固氮酶活性的菌株, 从形态学、生理生化特性、16S rDNA 以及固氮基因 *nifH* 等方面对两株菌进行了筛选和鉴定。培养条件优化结

果表明芽孢杆菌 *Bacillus* sp. 3A 的最适温度、pH 以及盐度分别为 31.49℃、8.18 和 2.585%, 海旋菌 *Thalassospira* sp. 4G 的最适温度、pH 以及盐度分别为 37.27℃、7.99 和 2.920%; 在适宜培养条件下, 两株菌具有 8~10 h 的快速对数生长期, 20 h 后进入衰亡期。研究结果为后续微生物接种剂或海草固氮菌肥的研制与应用提供了菌种资源和理论依据, 今后可扩大培养固氮菌株, 进一步研究菌株对鳗草的实际促生效果。

参考文献:

- [1] Nellemann C, Corcoran E, Duarte C M, et al. Blue Carbon. A rapid response assessment[C]. United Nations Environment Programme: GRID-Arendal, 2009, www.grida.no.
- [2] Waycott M, Duarte C M, Carruthers T J B, et al. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2009, 106(30): 12377-12381.
- [3] Liu Z G. Visit China Rare Houses: Sea Straw[M]. Beijing: Ocean Press of China, 2008: 197-198. [刘志刚. 探访中国稀世民居: 海草房[M]. 北京: 海洋出版社, 2008: 197-198.]
- [4] Shen J P, He J Z. Responses of microbes-mediated carbon and nitrogen cycles to global climate change[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(11): 2957-2967. [沈菊培, 贺纪正. 微生物介导的碳氮循环过程对全球气候变化的响应[J]. *生态学报*, 2011, 31(11): 2957-2967.]
- [5] Du J G, Cheung W L, Chen B, et al. Progress and prospect of climate change and marine biodiversity[J]. *Biodiversity Science*, 2012, 20(6): 745-754. [杜建国, Cheung W L, 陈彬, 等. 气候变化与海洋生物多样性关系研究进展[J]. *生物多样性*, 2012, 20(6): 745-754.]
- [6] Zhang Y B, Cao H, Zhuang T C, et al. Advances in the research on nitrogen-fixing microorganisms in mangrove forest[J]. *Marine Science Bulletin*, 2003, 22(6): 79-82. [张瑜斌, 曹卉, 庄铁诚, 等. 红树林固氮微生物研究进展[J]. *海洋通报*, 2003, 22(6): 79-82.]
- [7] Karl D, Letelier R, Tupas L, et al. The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical North Pacific Ocean[J]. *Nature*, 1997, 388(6642): 533-538.
- [8] Montoya J P, Holl C M, Zehr J P, et al. High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean[J]. *Nature*, 2004, 430(7003): 1027-1032.
- [9] Hiltner L. Über neuer erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache[J]. *Arb Dtsch Landwirtsch Ges*, 1904, 98: 59-78.

- [10] Hinsinger P, Marschner P. Rhizosphere-perspectives and challenges-a tribute to Lorenz Hiltner 12-17 september 2004-Munich, Germany[J]. Plant and Soil, 2006, 283(1): vii-viii.
- [11] Gong J, Song Y J, Zhang X L. Phylogenetic and functional diversity of nitrogen cycling microbes in coastal sediments[J]. Biodiversity Science, 2013, 21(4): 433-444. [龚骏, 宋延静, 张晓黎. 海岸带沉积物中氮循环功能微生物多样性[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 433-444.]
- [12] Weidner S, Arnold W, Puhler A. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. Appl Environm Microbiol, 1996, 62(3): 766-771.
- [13] Bagwell C E, Rocque J R, Smith G W, et al. Molecular diversity of diazotrophs in oligotrophic tropical seagrass bed communities[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 39(2): 113-119.
- [14] Jensen S I, Kühl M, Priemé A. Different bacterial communities associated with the roots and bulk sediment of the seagrass *Zostera marina*[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2007, 62(1): 108-117.
- [15] Xiao Y P, Chen J J, Zhang Y H, et al. Studies on the chemical constituents of *Fusarium* sp. F-1 from seagrass endophytic fungus[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2004, 23(5): 11-13. [肖义平, 陈晶晶, 张云海, 等. 海草内生真菌 *Fusarium* sp. F-1 化学成分研究[J]. 中国海洋药物, 2004, 23(5): 11-13.]
- [16] Ling J, Dong J D, Zhang Y Y, et al. Isolation and characterization of a N₂-fixing bacterium from the mangrove rhizosphere and study on its nitrogen-fixing ability[J]. Journal of Tropical of Oceanography, 2010, 29(5): 149-153. [凌娟, 董俊德, 张燕英, 等. 一株红树林根际固氮菌的分离、鉴定以及固氮活性测定[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 149-153.]
- [17] Wu H, Chen W, Wang G, et al. Culture-dependent diversity of actinobacteria associated with seagrass (*Thalassia hemprichii*) [J]. Afr J Microbiol Res, 2012, 6(1): 87-94.
- [18] Riley D, Barber S A. Bicarbonate accumulation and pH changes at the soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) root-soil interface1[J]. Soil Sci Soc Am J, 1969, 33(6): 905-908.
- [19] Riley D, Barber S A. Salt accumulation at the soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) root-soil interface1[J]. Soil Sci Soc Am J, 1970, 34(1): 154-155.
- [20] Smith G W, Hayasaka S S. Nitrogenase activity associated with *Halodule wrightii* roots[J]. Appl Environm Microbiol, 1982, 43(6): 1244-1248.
- [21] Xi L Q, Yao T, Yang J J, et al. Porperty of associative nitrogen-fixing bacteria producing IAA and its promoting growth of oat[J]. Grassland & Turf, 2005, 111(4): 25-29. [席琳乔, 姚拓, 杨俊基, 等. 联合固氮菌株分泌能力及其对燕麦的促生效应测定[J]. 草原与草坪, 2005, 111(4): 25-29]
- [22] Bai J P. Gram staining technology research[J]. Gansu Science and Technology Aspect, 2012, 41(1): 125-126. [白菊萍. 革兰氏染色技术的相关探讨研究[J]. 甘肃科技纵横, 2012, 41(1): 125-126.]
- [23] Li R F, Zhao Y F, Xue W W, et al. Sequencing and phylogenetic analysis of the partial 16S rRNA in a *Bacillus* strain[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(3): 121-122. [李瑞芳, 赵玉峰, 薛雯雯, 等. 一株芽孢杆菌 16S rRNA 的基因序列测定和系统进化分析[J]. 广东农业科学, 2011, 38(3): 121-122.]
- [24] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification in phylogenetic study[J]. J Bacteriol, 1991, 173(2): 697-703.
- [25] Dong J, Wang Y, Zhang Y. Spatial and seasonal variations of Cyanobacteria and their nitrogen fixation rates in Sanya Bay, South China Sea[J]. Sci Mar, 2008, 72(2): 239-251.
- [26] Pereg-Gerk L, Sar N, Lipkin Y. *In situ*, nitrogen fixation associated with seagrasses in the Gulf of Elat (Red Sea)[J]. Aqua Ecol, 2002, 36(3): 387-394.
- [27] Kemp P F, Sherr B F, Sherr E B, et al. Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology[M]. Oregon: CRC Press, 1993: 621-629.
- [28] Buchanan R E, Gibans N E. Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 1984. [布坎南·R·E, 吉本斯·N·E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.]
- [29] Ueda T, Suga Y, Yahiro N, et al. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences[J]. J Bacteriol, 1995, 177(5): 1414-1417.
- [30] Mittal S K, Goel S. BOD exertion and OD₆₀₀ measurements in presence of heavy metal ions using microbes from dairy wastewater as a seed[J]. J Water Res Prot, 2010, 2(5): 478-488.
- [31] Tao L X, Xia T J, Chang H P. Comparing with two different methods of measuring *Azotobacter* NT06 growth[J]. Journal of Biology, 2007, 24(5): 57-58. [陶令霞, 夏铁骑, 常慧萍. 两种测定固氮菌 NT06 菌株生长曲线方法的比较[J]. 生物学杂志, 2007, 24(5): 57-58.]
- [32] Moore K A, Orth R J, Nowak J F. Environmental regulation of seed germination in *Zostera marina*, L. (eelgrass) in Chesapeake Bay: effects of light, oxygen and sediment burial[J]. Aqua Bot, 1993, 45(1): 79-91.
- [33] Welsh D T. Nitrogen fixation in seagrass meadows: Regulation, plant-bacteria interactions and significance to primary productivity[J]. Ecol Lett, 2000, 3(1): 58-71.

- [34] Patriquin D, Knowles R. Nitrogen fixation in the rhizosphere of marine angiosperms[J]. Mar Biol, 1972, 16(1): 49–58.
- [35] Wang H K, Dong J D, Zhang S, et al. Distribution of N/P ratio and its limitation to growth of phytoplankton in sanya bay[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2002, 21(1): 33–39. [王汉奎, 董俊德, 张恩, 等. 三亚湾氮磷比值分布及其对浮游植物生长的限制[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(1): 33–39.]
- [36] Dong J D, Wang H K, Zhang S, et al. Marine nitrogen-fixing organisms and their contribution to the N and C requirement for marine biological production[J]. Acta Ecologica Sinica, 2002, 22(10): 1741–1749. [董俊德, 王汉奎, 张恩, 等. 海洋固氮生物多样性及其对海洋生产力的氮、碳贡献[J]. 生态学报, 2002, 22(10): 1741–1749.]
- [37] Risgaard-Petersen N, Dalsgaard T, Rysgaard S, et al. Nitrogen balance of a temperate eelgrass *Zostera marina* bed[J]. Mar Ecol Progr, 1998, 174(1): 281–291.
- [38] Guzmán A, Obando M, Rivera D, et al. Selection and characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR's) associated with cotton crop (*Gossypium hirsutum*)[J]. Rev Colomb Biotechnol, 2012, 14(1): 182–190.
- [39] Adriana Rojas, Gina Holguin, Glick B R, et al. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 35(2): 181–187.
- [40] Ling J, Dong J D, Zhang Y Y, et al. Isolation and characterization a N₂-fixing bacterium from coral reef-seagrass ecosystem[J]. Microbiology China, 2010, 37(7): 962–968. [凌娟, 董俊德, 张燕英, 等. 一株珊瑚礁-海草床复合生态系统固氮菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 962–968.]
- [41] Choi J H, Im W T, Yoo J S, et al. *Paenibacillus donghaensis* sp. nov., a xylan-degrading and nitrogen-fixing bacterium isolated from East Sea sediment[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(2): 189–193.
- [42] Dang H, Yang J, Li J, et al. Environment-dependent distribution of the sediment *nifH*-harboring microbiota in the Northern South China Sea[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(1): 121–132.
- [43] Dong J D, Ling J, Zhang Y Y, et al. A kind of deep sea *Thalassospira* bacteria and its application[P]. China patent:101691556, 2010-4-7. [董俊德, 凌娟, 张燕英, 等. 一种深海海旋菌及其应用[P]. 中国专利: 101691556, 2010-4-7.]
- [44] Zhang L H, Liu Y F, Hu Q P. Isolation and identification of a *Paenibacillus* sp. producing nitrogenase activity from South China Sea[J]. Marine Sciences, 2015, 39(3): 100–105. [张丽红, 刘艳芳, 胡青平. 中国南海一株固氮类芽孢杆菌的筛选和分离鉴定[J]. 海洋科学, 2015, 39(3): 100–105.]
- [45] Li X X. Analysis of genome sequence and *nifH* genes and heterologous expression of nitrogenase genes from nitrogen-fixing *Paenibacillus*[D]. Beijing: China Agricultural University, 2016. [李鑫鑫. 固氮类芽孢杆菌基因组分析、固氮基因功能及固氮酶异源表达研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.]
- [46] Guo X, Huang X Y, Li R H, et al. Optimization of culture condition for hyphae growth and toxin production of *Alternaria tenuis* of *Onobrychis viscariaefolia* Scop[J]. Acta Agrestia Sinica, 2009, 17(2): 255–258. [郭霞, 黄晓亚, 李瑞华, 等. 红豆草黑腐病菌菌丝生长和产毒培养条件的优化[J]. 草地学报, 2009, 17(2): 255–258.]
- [47] Liu X L, Yang L Q, Lü L, et al. Screening, identification and culture optimization of nitrogen-fixing bacteria in tobacco rhizosphere[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2015, 21(1): 89–94. [刘晓璐, 杨柳青, 吕乐, 等. 烟草根际固氮菌的筛选、鉴定及优化培养[J]. 中国烟草学报, 2015, 21(1): 89–94.]
- [48] Zhang G X, Lu Z Z. Isolation identification and distribution of nitrogen-fixing *Bacillus* in plant rhizosphere[J]. Amino Acids and Biotic Resources, 1998, 20(1): 12–15. [张高峡, 卢振祖. 作物根际联合固氮芽孢杆菌的分离鉴定及生态分布[J]. 氨基酸和生物资源, 1998, 20(1): 12–15.]
- [49] Liu R C, Li F T, Hao Z R, et al. Research on wheat yield increasing effect by inoculation of associated nitrogen fixing bacteria[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 1989, 4(3): 74–80. [刘荣昌, 李凤汀, 郝正然, 等. 小麦接种联合固氮菌增产效果研究[J]. 华北农学报, 1989, 4(3): 74–80.]
- [50] Fang D H, Zhao Y H, Mu Y X, et al. Basic biological properties of pgpr strain GP13 for the biocontrol of tobacco black shank[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2002, 24(5): 406–408. [方敦煌, 赵玉虎, 沐应祥, 等. 拮抗菌株 GP13 的基本生物学特性研究[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(5): 406–408.]
- [51] Chen Y F. Osmosis for the Influence of Bacteria[J]. Journal of Taiyuan normal university: Natural Science Edition, 2012, 11(1): 136–139. [陈燕飞. 渗透压对细菌的影响[J]. 太原师范学院学报: 自然科学版, 2012, 11(1): 136–139.]
- [52] Shen L, Zeng F Y, Tan Z Y. Effects of pH, temperature, NH₄⁺ and salinity on acetylene reduction (nitrogen fixation) in endophytic diazotrophs from *Paspalum orbiculare*[J]. Journal of Taiyuan Normal University: Journal of Tropical & Subtropical Botany, 2007, 15(1): 40–44. [申磊, 曾凤云, 谭志远. pH、温度、NH₄⁺和盐度对圆果雀稗内生固氮菌固氮特性的影响[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(1): 40–44.]
- [53] Dicker H J, Smith D W. Effects of salinity on acetylene reduction (nitrogen fixation) and respiration in a marine azotobacter[J]. Appl Environm Microbiol, 1981, 42(4): 740–744.
- [54] Verstrepen K J, Iserentant D, Malcorps P, et al. Glucose and

sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast?[J]. Trends Biotechnol, 2004, 22(10): 531–537.

[55] Rezaei M N, Dornez E, Jacobs P, et al. Harvesting yeast

(*Saccharomyces cerevisiae*) at different physiological phases significantly affects its functionality in bread dough fermentation[J]. Food Microbiol, 2014, 39(5): 108–115.

Isolation and characterization of nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Zostera marina* and optimization of its culture conditions

WANG Qi¹, LI Wentao¹, ZHANG Peidong¹, ZHANG Xiumei^{1,2}

1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries and Aquaculture, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266072, China

Abstract: Seagrass beds are highly productive ecosystems that provide essential habitat and food for various marine species. However, seagrasses have been declining worldwide for decades because of human activities and global climate change. The conservation and restoration of seagrasses has become extremely urgent, especially in China. Recent studies showed that, in the rhizosphere of seagrasses, the organic carbon exudates from plant residues and roots are an important carbon source for *Azotobacter*. Nitrogen fixation by *Azotobacter* could provide nitrogen for the growth of the plants, thereby promoting the restoration of seagrasses. Therefore, investigating N₂ fixation by *Azotobacter* in the seagrass rhizosphere is essential since it might play an important role in the nitrogen cycle of the seagrass bed ecosystem. In this study, the growth-promoting activities of the rhizobacteria of eelgrass *Zostera marina* was investigated by isolating two nitrogen-fixing strains (3A and 4G) from the rhizosphere sediments of *Z. marina* by using N-free medium. Based on the morphology, physiological and biochemical characteristics, sequence analysis of 16S rDNA, and the nitrogenase structural gene *nifH*, we identified the 3A bacterium as *Thalassospira* sp. and 4G bacterium as *Bacillus* sp.. The optimal culture conditions for the two Rhizobium strains were established, and typical growth curves for the two strains were obtained. In particular, strain 3A was a gram-positive bacterium and had an orange yellow-colored circular colony. In addition, it used D-mannose, D-melezitose, and L-rhamnose as carbon sources. The optimal growth temperature, pH, and salinity of 3A were 31.49°C, 8.18, and 2.585%, respectively. In contrast, strain 4G was gram-negative bacteria and had milky circular colony. It could use a series of hydrocarbons as carbon sources, such as D-cellobiose, D-glucose, D-maltose, sucrose, D-mannitol, and D-trehalose. Its optimal growth temperature, pH, and salinity were 37.27°C, 7.99, and 2.920%, respectively. Previous studies have shown that *Thalassospira* sp. can promote seagrass growth and increase the content of carotene, soluble sugar, and other substances, indicating that this species is a kind of growth-promoting bacteria. Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. is a typical plant growth-promoting bacterium with strong stress resistance that can produce beneficial plant growth-promoting and antibacterial substances. The nitrogen fixation rates of 3A and 4G were 252.21 nmol C₂H₄/(mL·h) and 196.31 nmol C₂H₄/(mL·h), as revealed by the acetylene reduction method. Comparison with the nitrogen-fixing bacteria reported in other studies revealed that the two strains isolated in this study showed good nitrogen fixation ability. Under suitable growth conditions, the two bacterial strains exhibited logarithmic phase proliferation. Accurate positioning of the bacterial growth logarithmic phase and elucidating the growth characteristics of the bacterial strains could provide basic data for the production of bacterial fertilizers in the future. The bacterial strains obtained in this study might be applied in the future development and application of microbial inoculants and seagrass *Azotobacter* fertilizers, thereby benefiting the recovery of *Z. marina* beds in the future.

Key words: *Zostera marina*; N₂-fixing bacteria; 16S rDNA; nitrogenase activity; *Bacillus* sp.; *Thalassospira* sp.

Corresponding author: ZHANG Xiumei. E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn